

氏名	しら いし かず のり 白 石 一 乗
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2505 号
学位授与の日付	平成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学研究科生理系専攻
学位論文題目	Persistent induction of somatic reversions of the pink-eyed unstable mutation in F1 mice born to fathers irradiated at the spermatozoa stage (マウス P 遺伝子座における遺伝的不安定性を介した復帰突然変異の解析)
論文調査委員	(主査) 教授 武田 俊一 教授 藤堂 剛 教授 丹羽 太貴

論 文 内 容 の 要 旨

放射線による突然変異は、これまで DNA2 本鎖切断が修復間違いや複製間違いをおこす過程で直接的に生じるとされてきた。しかしながら最近の培養細胞を用いた研究から、放射線はゲノム不安定性を誘導し、これが 2 次的に突然変異を誘発する機構の存在が明らかになってきた。本研究では、放射線誘発ゲノム不安定性について、マウス個体レベルでの解析を試みた。

ゲノム不安定性による突然変異を検出するマーカーとしてマウス pink-eyed dilution 遺伝子を用いた。この遺伝子の変異の一つに pinke-eyed unstable allele があり、これは野生型遺伝子が 70kb の重複で生じたもので、色素細胞はメラニン顆粒を産成できず、マウスは薄い色の毛色とピンク色の目を持つ。さらにこの変異は、重複領域が相同組換えを起こして欠失することにより、野生型の毛色と目色に復帰突然変異する。本研究では、網膜色素上皮の黒斑を指標としたが、これは復帰突然変異で生じた黒色色素上皮細胞の集団数が多いものほど組織分化の初期に生じた突然変異であることから、斑の大きさが突然変異生成の時期の指標になりうるという利点を考慮したものである。

本研究では、pink-eyed unstable (p^{um}) 系統と、同遺伝子座の欠失で生じ復帰突然変異は起こさない pin-eyed dilution Jackson (p^J) 系統を用いた。実験では雄 p^J マウスに放射線照射を行い、雌 p^{um} マウスと交配して生まれた F1 マウスを解析した。そして照射から交配までの時期を変えることにより、精子期照射(照射直後の交配)と精原細胞期照射(照射後 15 週での交配)の影響を解析した。生まれた F1 マウスでの p^{um} allele の体細胞復帰突然変異頻度は、精子期照射により上昇したが、精原細胞期照射ではこの上昇は見られなかった。体細胞復帰突然変異の上昇は線量依存的であり、6Gy の線量でその頻度は非照射雄から生まれた対照群の 2 倍に達した。これらの結果は、照射精子が受精の時期において持ち込んだ DNA 損傷が、その後の発生の過程で長期にわたってゲノム不安定性を誘導し、これが母親由来の p^{um} allele に復帰突然変異をもたらしたものと判断される。また精原細胞期の照射では、このような DNA 損傷は完全に修復されて受精の時期までは残っていなかったため、ゲノム不安定性の誘導が無かったものと判断される。

網膜色素上皮の黒斑の頻度(Y)と黒斑に含まれる黒色色素細胞数(X)の関係は、対照群については $Y=3.1X^{-2.1}$ 、照射群については $Y=4.7X^{-2.1}$ であった。この結果は、復帰突然変異の頻度が網膜色素上皮の発生過程を通じて一定であり、しかも精子照射によりこれが一様に上昇していることを意味する。すなわち、照射精子により誘導されるゲノム不安定性の程度は、網膜色素上皮の発生・分化の期間において一定で推移することを示している。

以上より、受精卵に導入された DNA 損傷はその後の発生の過程で長期にわたってゲノムの不安定性を誘発し、照射精子由来が非照射卵由来かに関わらず p^{um} allele の組換え頻度を上昇させる。すなわちマウス個体を用いた次世代突然変異検出系においても、放射線によるゲノム不安定性は、遅延的に非標的突然変異を誘発する。今回の研究は、放射線照射次世代に見られる発がんの機構を考える上できわめて重要である。さらにこの現象の分子機構の解明は、今後の重要な課題である。

論文審査の結果の要旨

放射線照射された培養細胞では、ゲノム不安定性が誘導され、照射後長い期間に遅延突然変異を生じることが示されている。本研究では、この放射線誘発ゲノム不安定性について、照射マウス次世代での体細胞突然変異検出系を用いて解析を試みた。

マウス *pinke-eyed unstable* (p^{un}) アレルは、*pink-eyed dilution* 遺伝子座が部分重複することにより不活性化したものである。そして重複した遺伝子間の組み換えを、それを起こした細胞の黒化で確実に検出できる。同遺伝子座の欠損した雄マウスに X 線照射を行い、 p^{un} アレルを持つマウスと雌と交配し F1 マウスを得た。この F1 マウス胎児において網膜色素上皮細胞が黒化したスポットの数を解析することにより、X 線照射されていない母方 p^{un} アレルの組み換えの頻度を解析したところ、その頻度は、精子への放射線照射量依存的に上昇し、6Gy 照射群で 2 倍に達した。この知見は、照射精子の DNA 損傷がその精子から発生した個体のゲノム不安定性を誘導し、その個体を構成する細胞の母親由来アレルに組み換えを誘発したことを示す。黒化した個々のスポットの大きさから、ゲノム不安定性は網膜色素上皮の発生過程すべてで一様に上昇していることが明らかになった。

以上の研究は、放射線照射が次世代に影響することを明確に示し、放射線の変異誘導機構の解明に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成14年2月26日実施の論文内容とそれに関連した諮問を受け、合格と認められたものである。